

Japan se Abstract 4-502408

by: Brian Fish

**TITLE: CHIMERIC IMMUNOGLOBULINS SPECIFIC FOR p55 TAC PROTEIN  
OF THE IL-2 RECEPTOR**

**ABSTRACT:**

The present invention provides novel compositions useful, for example, in the treatment of T-cell mediated human disorders, the compositions containing human-like immunoglobulins specifically capable of blocking the binding of human IL-2 to its receptor and/or capable of binding to the p55 Tac protein on human IL-2 receptors. The immunoglobulins can have two pairs of light chain/heavy chain complexes, typically at least one pair having chains comprising mouse complementarity determining regions functionally joined to human framework region segments. For example, mouse complementarity determining regions, with or without additional naturally-associated mouse amino acid residues, can be used to produce human-like antibodies capable of binding to the human IL-2 receptor at affinity levels stronger than about  $10^8 M^{-1}$ . The immunoglobulins, including binding fragments and other derivatives, of the present invention may be produced by a variety of recombinant DNA techniques, with ultimate expression in transfected cells, preferably immortalized eukaryotic cells, such as myeloma or hybridoma cells. Polynucleotides comprising a first sequence coding for human-like immunoglobulin framework regions and a second sequence set coding for the desired immunoglobulin complementarity determining regions can be produced synthetically or by combining appropriate cDNA and genomic DNA segments.

The human-like immunoglobulins may be utilized alone in substantially pure form, or complexed with a cytotoxic agent, such as a radionuclide, a ribosomal inhibiting protein or a cytotoxic agent active at cell surfaces. All of these compounds will be particularly useful in treating T-cell mediated disorders. The human-like immunoglobulins or their complexes can be prepared in a pharmaceutically accepted dosage form, which is dependent on the mode of administration.

The present invention also provides novel methods for designing human-like immunoglobulin chains having one or more complementarity determining regions (CDR's) from a donor immunoglobulin and a framework region from a human immunoglobulin, the preferred methods comprising first comparing the framework or variable region amino acid sequence of the donor immunoglobulin to corresponding sequences in a collection of human immunoglobulin chains, and selecting as the human immunoglobulin one of the more homologous sequences from the collection. The human immunoglobulin, or acceptor immunoglobulin, sequence is typically selected from a collection of at least 10 to 20 immunoglobulin chain sequences, and usually will have the highest homology to the donor immunoglobulin sequence of any sequence in the collection. The human immunoglobulin framework sequence will typically have about 65 to 70% homology or more to the donor immunoglobulin framework sequences. The donor immunoglobulin may be either a heavy chain or light

chain (or both), and the human collection will contain the same kind of chain. A humanized light and heavy chain can be used to form a complete humanized immunoglobulin or antibody, having two light/heavy chain pairs, with or without partial or full-length human constant regions and other proteins.

In another embodiment of the present invention, either in conjunction with the above comparison step or separately, additional amino acids in an acceptor immunoglobulin chain may be replaced with amino acids from the CDR-donor immunoglobulin chain. More specifically, further optional substitutions of a human framework amino acid of the acceptor immunoglobulin relying on a framework amino acid from a donor immunoglobulin will be made at positions in the immunoglobulins where:

- (a) said amino acid in the human framework region of an acceptor immunoglobulin is rare for that position and the corresponding amino acid in the donor immunoglobulin is common for that position in human immunoglobulin sequences; or
- (b) said amino acid is immediately adjacent to one of the CDR's; or
- (c) said amino acid is predicted to be within about 3A of the CDR's in a three-dimensional immunoglobulin model and capable of interacting with the antigen or with the CDRs of the humanized immunoglobulin.

The humanized immunoglobulin chain will typically comprise at least about 3 amino acids from the donor immunoglobulin in addition to the CDR's, usually at least one of which is immediately adjacent to a CDR in the donor immunoglobulin. The heavy and light chains may each be designed by using any one or all three of the position criteria.

When combined into an intact antibody, the humanized light and heavy chains of the present invention will be substantially non-immunogenic in humans and retain substantially the same affinity as the donor immunoglobulin to the antigen (such as a protein or other compound containing an epitope). These affinity levels can vary from about  $10^8 \text{ M}^{-1}$  or higher, and may be within about 4 fold of the donor immunoglobulin's original affinity to the antigen.

④ 日本国特許庁 (JP)  
② 公表特許公報 (A)

① 特許出願会員

平4-502408

③ Int. Cl.  
C 12 P 21/08

案別記号

序内整理番号

8214-4B  
8717-4B  
7236-4B

C 12 N

審査請求  
子審査請求  
有

15/00  
5/00

未請求

A  
B※

④ 公表 平成4年(1992)5月7日

部門(区分)

1 (1)

⑤ 発明の名称

IL-2 レセプターの p55 Tac タンパク質に特異的なキメラ免疫グロブリン  
⑥特・願 平2-503677  
⑦出願 平1(1989)12月28日

(全 16 頁)

優先権主張

⑧発明者  
クイーン, カリー エル.

⑨出願人

プロテイン デザイン ラブ  
ス, インコーポレイティド  
弁理士 青木 明 外3名

⑩代理人

AT, AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BC, BJ(広域特許), BR, CF(広域特許), CC(広域特許), CH, CH(広域特許), DE, DE(広域特許), DK, ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB, GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, KR, LK, LU, LU(広域特許), MC, MG, ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL, NL(広域特許), NO, RO, SD, SE, SE(広域特許), SN(広域特許), SU, TD(広域特許), TC(広域特許).

⑪指定国

最終頁に続く

⑫既文提出日 平3(1991)5月1日  
⑬国際出願 PCT/US89/05857  
⑭医療公開番号 WO90/07861  
⑮国際公開日 平2(1990)7月26日

請求の範囲

1. p55 Tac タンパク質と特異的に反応する実質的に純粋なヒト種免免疫グロブリンを含んで成る組成物。
2. 前記免免疫グロブリンが2対の軽鎖/重鎖二量体を含んで成り、各鎖が可変領域と定常領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。
3. ヒトイントロイキン-2 (IL-2) レセプターへのヒトIL-2の結合を阻害することができる実質的に純粋なヒト種免免疫グロブリンを含んで成る組成物。
4. 前記免免疫グロブリンが約  $10^8 M^{-1}$  またはそれより強いヒトイントロイキン-2 (IL-2) への結合親和力を示す、請求項1に記載の組成物。
5. 前記免免疫グロブリンが1つの免免疫グロブリンからの相補性決定領域および少なくとも1つの異なる免免疫グロブリンからのフレームワーク領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。
6. ヒト種フレームワーク領域および天然には該フレームワークと間違がないまたは複数の外側の相補性決定領域を含んで成る超換え免免疫グロブリン組成物であって、前記免免疫グロブリンがヒトイントロイキン-2 レセプターに結合することができる組成物。
7. 前記免免疫グロブリンが IgG, 免疫グロブリンイソタイプである、請求項5に記載の組成物。
8. 成熟酵母および革類可変領域タンパク質配列が図3お

よび図4中の成熟タンパク質配列と実質的に相同である、請求項5に記載の組成物。

9. 2対の軽鎖/重鎖二量体を有し且つ少なくとも約 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> の親和力でヒトイントロイキン-2 レセプター上のエピトープと特異的に反応することができるヒト種免免疫グロブリンであって、前記軽鎖および重鎖が相補性決定領域(CDR)とヒト種フレームワーク領域を含んで成り、ここでCDRが該フレームワーク領域とは異なる免免疫グロブリンからのものである、ヒト種免免疫グロブリン。

10. ヒトイントロイキン-2 (IL-2) レセプターへのヒトイントロイキン-2 (IL-2) の結合を阻止することができる、請求項9に記載の免免疫グロブリン。

11. ヒトイントロイキン-2 レセプターに結合することができるヒト化免免疫グロブリンであって、前記免免疫グロブリンはヒト種フレームワーク中に抗-Tac 抗体からの1または複数の相補性決定領域(CDR) を含んで成り、ここで前記ヒト種フレームワーク領域は抗-Tac 抗体から導入された少なくとも1つのアミノ酸を含んで成る、ヒト化免免疫グロブリン。

12. 図3に示されるような成熟酵母可変領域、および図4に示されるような成熟酵母配列を有する、請求項11に記載のヒト化免免疫グロブリン。

13. 抗-Tac 抗体からの追加のアミノ酸がCDRのすぐ近くに存在する、請求項11に記載のヒト化免免疫グロブリン。

14. ヒト蛋白において丁細胞介在性障害を処置する方法であって、前記蛋白に治療的有用性の請求項1に記載の免免疫

特表平4-502408 (2)

ロブリンを投与することを含んで成る方法。  
15. ミニローマまたはハイブリドーマ細胞中で生成された請求項1に記載の免疫グロブリン。  
16. ヒト種免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一の配列および1または複数のマウス免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリヌクレオチド分子であって、発現時に pSS Tacタンパク質と特異的に反応し且つヒトT細胞上のインターロイキン-2レセプター(IL-2)へのIL-2の結合を阻止することができる免疫グロブリンをコードする前記ポリヌクレオチド分子。  
17. 請求項16またはポリヌクレオチドによりトランスクルエクトされた細胞質。  
18. 供与体 Igからの1または複数の相補性決定領域およびヒト Igからのフレームワーク領域を有するヒト化免疫グロブリン類の設計方針であって、供与体 Ig 種類または組成のフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒト Ig 領域のコレクション中の対応する配列と比較し、そしてヒト Ig 種類または組成のフレームワークを提供するためにコレクションからの約3つの最も相向性の配列のうちの1つを選択することを含んで成る方法。  
19. ヒト受容体免疫グロブリンからのフレームワーク領域および抗原に結合することができる供与体免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)を有するヒト化免疫グロブリン類の設計方針であって、下記のような免疫グロブリン中の位置において、受容体免疫グロブリンの少なくとも1つのヒトフ

レームワークアミノ酸を供与体免疫グロブリンからの外方にアミノ酸で置換する段階を含んで成る方法：

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中のアミノ酸がその位置においてされであり、そして供与体免疫グロブリンの対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン配列中の前記位置において前述である；または

(b) 该アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 该アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3Å以内に側鎖原子を有してして近接またはヒト化免疫グロブリンのCDRと相互作用することができると予想される。

20. 前記ヒト化免疫グロブリン類が、CDRに加えて、基準(a), (b) または(c)により選択された供与体免疫グロブリンからの少なくとも3アミノ酸を含んで成る、請求項19に記載の方法。

21. 供与体から置換されたアミノ酸のうちの少なくとも1つがCDRのすぐ近くである、請求項20に記載の方法。

22. 請求項18, 19または20に從って登録されたヒト化免疫グロブリン。

#### 明細書

##### IL-2レセプターのpSS Tacタンパク質に特異的なキメラ免疫グロブリン

##### 発明の分野

本発明は一般に、新規治療法を開拓するための経済的DNA技術とモノクローナル抗体技術の組合せに關し、更に詳しくは、非免疫性抗体の製造およびそれらの利用に関する。

##### 発明の背景

哺乳類では、外来物質、即ち抗原、と特異的に相互作用する2つのタイプの細胞によって免疫反応が媒介される。これらの細胞タイプの1つであるB細胞は、抗体の生産を担う。第二の細胞クラスであるT細胞は、B細胞とT細胞を含む広範な他の造血細胞の両者の生体内機能を調節する様々な細胞ナップセットを包含する。

T細胞がこの調節に力を及ぼす1つの方法は、最初はT細胞表面因子と命名されたインターロイキン-2(IL-2)として知られるリンホカインの生産を促してである。IL-2の主な機能はT細胞の刺激と維持であると思われる。実際、或る免疫学者はIL-2が全免疫応答の中心にあるだろうと考えている(Farrar, J.ら, *Immunol. Rev.*, 63: 123-166 (1982)参照、これは参考として本明細書に組み込まれる)。

その生物学的作用を及ぼすために、IL-2は特異的な高

親和性抗レセプターと相互作用する(Greene, M.ら, *Progress in Immunology* 117, E. Brown編, Greene and Stallton, New York (1986), 283-295頁)。ヒトIL-2レセプターは複数な多量の細胞タンパク質であり、1本の鎖は Tacペプチドとして知られ約55kDのサイズである(Leonard, M.ら, *J. Biol. Chem.*, 260: 1872 (1985)参照、これは参考として本明細書中に組み込まれる)。このタンパク質をコードする遺伝子が単離されており、そして21アミノ酸のシグナルペプチドを含む272アミノ酸のペプチドを推定している(Leonard, M.ら, *Nature* 311: 626 (1984)参照)。pSS Tacタンパク質のN-末端の219アミノ酸は明らかに細胞外領域を含んで成る(Leonard, M.ら, *Science* 230: 633-639 (1984)参照、これは参考として本明細書に組み込まれる)。

ヒトIL-2レセプターの構造と性質の解明のほとんどは、特異的反応性モノクローナル抗体の開発のためである。特に、抗-Tacとして知られるマウスモノクローナル抗体(Uchiyamaら, *J. Immunol.*, 126: 1393 (1981))は、IL-2レセプターがT細胞上だけでなく、単球-マクロファージ群、肝臓のクッパー細胞、皮膚のラングルハンス細胞およびもちろん活性化されたT細胞上でも検出されることを示した。重要なことには、静止T細胞、B細胞または癌細胞しているマクロファージは、典型的にはIL-2レセプターを表示しない(Hermannら, *J. Exp. Med.*, 162: 1111 (1985))。

抗-Tacモノクローナル抗体は、IL-2相互作用を必要とするリンパ球機能を明らかにするためにも用いられており、

そして筋肉培養における細胞活性およびアブレッサータンパクの発生を含む様々なT細胞機能を抑制することが示されている。また、抗-Tac および他の抗体を用いた研究に基づき、種々な結果、特に成人T細胞白血病がT細胞による不活性化(L-2レセプター発現)に因縁づけられている。

より最近になって、L-2レセプターはT細胞介在免疫に対する新規治療アプローチの理想的な薬であることが示された。L-2レセプター特異的抗体は、例えば抗-Tacモノクローナル抗体を単独でまたは免疫複合体(例えばリシンA組、同位体等との免疫複合体)として用いて、L-2レセプターを有する細胞を効率的に除去できることが提唱されている。例えばそれらの要因は、理論上はL-2レセプターを発現している白血病細胞、又は腫瘍のB細胞、または病気状態に因る活性化されたT細胞を併除することができ、その上さらに必要とされる時には炎症正常T細胞およびそれらの前駆細胞の保持によって正常T細胞免疫を開始する能力を保有する。一般に、他のT細胞特異的要因の多くは本実験で剖明する。全体に、L-2レセプターに特異的な適当なモノクローナル抗体の使用は、自己免疫反応、器官移植および活性化されたT細胞による炎症の認知しくない患者において療法的効用を有することができる。実際、例えば抗-Tac抗体を使って臨床試験が開始されている(一般に、Walden, T. ら、*Cancer Res.* 45: 625 (1985) および Walden, T., *Science* 232: 727-732 (1986) を参照のこと; これらは弊社のL-2レセプターに対する要件を満たす)。

は、一品は予想不可能な結合親和性のためである不適かな結果を提供する。

従って、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、さらに治療用および他の用途に適当である形態において容易に且つ経済的に生産される改良形のヒト株免疫グロブリン、例えばヒトL-2レセプターに特異的なもの、に対する要求が存在する。本発明はそれらおよび他の要求を満たす。

#### 発明の要約

本発明は、例えばT細胞により媒介されるヒト癌の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は、L-2レセプターへのヒトL-2の結合を特異的に阻止することができて/またはヒトL-2レセプター上のpSS Tacタンパク質に結合することができるヒト株免疫グロブリンを含有する。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、典型的には少なくとも1対がヒトフレームワーク領域セグメントに選択的に選択されたマウス相補性決定領域を含んで成る組成物を有する。例えば、追加の天然白朮のマウスアミノ酸残基を有するかまたは有しないマウス相補性決定領域を用いて、約10<sup>4</sup>M<sup>-1</sup>よりも強力な親和力レベルにおいてヒトL-2レセプターに結合することができるヒト株抗体を生産することができる。

結合性断片または他の抗体を包含する免疫グロブリンは、種々な組換えDNA技術により、トランスクレプトされた抗体、好ましくは不活性化された真核細胞、例えばミエローマ細胞を生産することができる。

として本明細書中に組み込まれる)。

不適にも、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体の使用は、特に下記に説明されるような取り直し治療患者において、持つかの欠点を有する。例えば、マウスモノクローナル抗体はヒト補体を十分に結合せず、そしてヒトにおいて使用すると他の重要な免疫グロブリン機能を持たず。

おそらくより重要なのは、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体が、ヒト患者に注入すると免疫原となるであろう実質的且さのアミノ酸配列を含むことである。外来抗体の注入後、抗体に対して患者により惹起された免疫応答が非常に強力であり、最初の暴露後の抗体の治療効果を本質的に検討しうることを多数の研究が示している。更に、様々な病気を処理するために増加する数の異なるマウスまたは他の抗原性(ヒトに対して)モノクローナル抗体が開発されることは期待されるので、任意の異なる非ヒトモノクローナル抗体での第一回は第二の暴露後、無関係の治療のためにさえもその後の効果が無効または劣化になり得る。

いわゆる「キメラ抗体」(例えば、ヒト定常領域に連結されたマウス可変領域)は幾らか結果であることが剖明したが、重要な免疫原性の問題が残っている。一般に、多数のヒト抗原と同じく、ヒトL-2レセプターと反応するヒト免疫グロブリンの生産は、典型的なヒトモノクローナル抗体は生産技術を使うことは非常に困難である。同時に、いわゆる「ヒト化された」抗体(例えばEPO公報No 0239400 を参照のこと)を作製するために組換えDNA技術を使用すること

たはハイブリドーマ細胞中の最大発現を使って生産することができる。ヒト株免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一の配列と所望の免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリヌクレオチドは、合成的にまたは適当なcDNAとゲノムDNAセグメントを結合することによって作製することができる。

ヒト株免疫グロブリンは、実質的に純粋な形態で単独に、または細胞毒性物質、例えば放射性核種、リボソーム阻害タンパク質もしくは細胞表面において活性な細胞毒性物質と結合化して、使用することができる。これらの化合物は全て、特にT細胞により媒介される作用を遮蔽することにおいて有用であろう。ヒト株免疫グロブリンまたはそれらの組合体は、投与の形態に依存するであろう医薬上許容される用量において調製することができる。

本発明は、供与体免疫グロブリンからの1または数段の相補性決定領域(CDR) およびヒト免疫グロブリンからのフレームワーク領域を有するヒト株免疫グロブリン類を設計するための新規方法も提供する。好ましい方法は、供与体免疫グロブリンのフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒト免疫グロブリン類のコレクション中の対応する配列と比較し、そして該コレクションからより相同意の高い配列の1つをヒト免疫グロブリンとして選択することを含んで居る。ヒト免疫グロブリンまたは受容体免疫グロブリン配列は、典型的には少なくとも10~20の免疫グロブリン類配列のコレクションから選択され、そして通常は該コレクション中のいずれ

かの配列の供与体免疫グロブリン配列に最も高い相間性を有するだろう。ヒト免疫グロブリンフレームワーク配列は、供与体免疫グロブリンフレームワーク配列に対して典型的には約65~70%またはそれ以上の相間性を有するだろう。供与体免疫グロブリンは重ねまたは複数（または両方）のいずれであってもよく、そしてヒトコレクションは同じ種類の鎖を共有するだろう。ヒト化された軽鎖または重鎖を用いて、部分または全長のヒト定常鎖および別のタンパク質を含むかまたは含まない、2対の軽鎖/重鎖を有する完全なヒト化免疫グロブリンまたは抗体を免疫せしめることができる。

本発明の別の堅核によれば、上記の比較堅核と共にまた別々に、受容体免疫グロブリン中の追加のアミノ酸をCDR-供与体免疫グロブリンからのアミノ酸と置き換えることができる。更に特定的に、供与体免疫グロブリンからのフレームワークアミノ酸による受容体免疫グロブリンのヒトフレームワークアミノ酸の異なる位置の置換は、次のような免疫グロブリン中の位置において行うことができる：

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中の既アミノ酸がその位置に偏りあり、そして供与体免疫グロブリン中の対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン中のその位置に普遍である；

(b) 該アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3Å以内にあり、そしてヒト化免疫グロブリンの

CDRまたは抗原と相互作用することができると予想される。

ヒト化免疫グロブリンは、典型的には、CDRに加えて供与体免疫グロブリンからの少なくとも約3アミノ酸を込んで立り、通常は少なくともその1つが供与体免疫グロブリン中のCDRのすぐ近くであろう。3つの位置基準のうちのいずれか1つまたは全部を使うことにより重ねおよび軽鎖を各々設計することができる。

完全な抗体に結合される時、本発明のヒト化された軽鎖および重鎖はヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、そして供与体免疫グロブリンと実質的に同じ抗原（例えばエビトープを含むタンパク質または他の化合物）への親和力を保持しているだろう。それらの親和力レベルは約 $10^9 M^{-1}$ 以上から様々に異なることができ、そして抗原への供与体免疫グロブリンのものとの親和力の約4倍以内であろう。

#### 図面の簡単な説明

図1：抗-Tac 重鎖（上行）およびE<sub>u</sub> 軽鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの堅核中の同じアミノ酸は線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac 堅核においてE<sub>u</sub>アミノ酸よりもむしろ抗-Tac アミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は★で示されている。

図2：抗-Tac 堅核（上行）およびE<sub>u</sub> 軽鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の

最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの堅核中の同じアミノ酸は線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac 重鎖においてE<sub>u</sub>アミノ酸よりもむしろ抗-Tac アミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は★で示されている。

図3：ヒト化抗-Tac 重鎖可変領域遺伝子のスクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての翻訳アミノ酸配列がスクレオチド配列の下に示されている。塩基遺伝子の始まりと共に終わりのスクレオチドTCTAGAはIba1部位である。成熟重鎖配列はアミノ酸20のQで始まる。

図4：ヒト化抗-Tac 軽鎖可変領域遺伝子のスクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての翻訳アミノ酸配列がスクレオチド配列の下に示されている。塩基遺伝子の始まりと共に終わりのスクレオチドTCTAGAはIba1部位である。成熟重鎖配列はアミノ酸21のDで始まる。

図5：A. ヒト化抗-Tac 軽鎖遺伝子を合成するのに用いた、5'から3'方向に記載した4つのオリゴスクレオチドの配列。B. 前記オリゴスクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴスクレオチドの3'方向を指している。

図6：(A) ヒト化抗-Tac 軽鎖遺伝子を合成するのに用いた、5'から3'方向に記載した4つのオリゴスクレオチドの配列。(B) 前記オリゴスクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴスクレオチドの3'方向を指している。JF02とJF03とのオーバーラップ中のB1a2部位の位置が示されている。

図7：ヒト化抗-Tac 重鎖を発現させるのに用いるプラスミドpHuctTAC1の略図。関係する制限基部が示されており、そして重鎖のコード領域が縦として表示されている。免疫グロブリン(Ig)プロモーターからの転写方向が矢印により示されている。E<sub>1</sub>=重鎖ニンハンサー、Hyg=ヒグロマイシン耐性遺伝子。

図8：ヒト化抗-Tac 軽鎖を発現させるのに用いるプラスミドpHuctTAC の略図。関係する制限基部が示されており、そして軽鎖のコード領域が縦として表示されている。Igプロモーターからの転写方向が矢印により示されている。

図9：抗-Tac 抗体またはヒト化抗-Tac 抗体に次いで標識としてフルオレセイン後合ナギ抗体【 Ig抗体またはナギ抗Ig1g 抗体でそれぞれ染色された Hul-102 および Jurkat細胞のフルオロサイトメトリー。各パネルにおいて、点線曲線は第一抗体が附着された時は染色を示し、実線曲線は記載された第一および第二（結合）抗体を含む時の結果を示す。

図10：(A) 指標されるような0~40ngの抗-Tac、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコニリトリリン結合アビジンで染色された Hul-102 細胞のフルオロサイトメトリー。

(B) 指標の抗体、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコエリトリリン結合アビジンで染色された Hul-102 細胞のフルオロサイトメトリー。

## 発明の構造化記載

本発明の一実施によれば、所望のエピトープ、例えばヒトT細胞上のIL-2レセプター上のエピトープ、と特異的に反応するヒト様免疫グロブリンが供給される。それらの免疫グロブリンは、少なくとも約 $10^4 M^{-1}$ 、好みしくは $10^5 M^{-1}$ ~ $10^{10} M^{-1}$ またはそれ以上の結合親和力を有し、例えばヒトIL-2レセプターへのIL-2の場合を除くことができる。ヒト様免疫グロブリンは、ヒト様フレームワークを有し、そして $\alpha\beta\delta$ タンパク質上のニビトープと特異的に反応する免疫グロブリン、典型的にはマウス免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)を有することができる。本発明の免疫グロブリンは、基質的に大量に生産することができ、例えば、種々の技術によるヒト患者におけるT細胞介在性疾患の処置において、用途を見出す。

基本的な抗体構造単位は4量体を含むことが知られている。各4量体は全く同じ2対のポリペプチド鎖から成り、各対は1本の「桿」(約25kD)鎖と1本の「頭」(約50~70kD)鎖を有する。各鎖のNH<sub>2</sub>-末端は、主に抗原認知を担う約100~110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域で構成する。各鎖のCDR-末端は、主にエフェクター機能を担う定常領域を形成する。

種類は $\mu$ または $\delta$ のいずれかとして分類される。並列は $\tau$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ または $\epsilon$ として分類(および細分類)され、そしてそれぞれIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEとして抗体のイソタイプを確定する。堅苦しい用語中の可変および定常領域

は、約12またはそれより多量のアミノ酸の「J」領域により連結され、並列は約12またはそれより多量のアミノ酸の「D」領域も含む(一般に、Fundamental Immunology, Paul, W. E., 第2版、第131~166頁、Raven Press, N.Y. (1984) を参照のこと; これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

各種類/並列の可変領域は抗原結合部位を形成する。総て全て、3つの超可変領域によって結合された比較的保存されたフレームワーク領域という同じ一般構造を示す("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E. A. & U.S. Department of Health and Human Services, (1983); 並びにChothiaおよびLesk, J. Mol. Biol., 196: 901~917 (1987)を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる)。各対の二本鎖からのCDRは、フレームワーク領域によって整列され、特異的エピトープへの結合を可能にする。

本明細書で使用する「免疫グロブリン」なる用語は、免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされる!または複数のポリペプチドから成るタンパク質について呼称する。構成される免疫グロブリン遺伝子としては、 $\epsilon$ 、 $\lambda$ 、 $\mu$ 、 $\tau$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ および $\gamma$ 定常領域遺伝子、並びに多数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。免疫グロブリンは抗体の他に様々な形態で存在することができ、例えば、Fr. Fab およびFab(ab)<sub>2</sub>並びに一本鎖を包含する(例えば、Hestonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 5879~5883 (1988)およびBirdら、Science, 242: 423~426 (1988)。これらは参考として本明

細書中に組み込まれる)。【一般に、Woodら、"Immunology", Benjamin, N.Y., 第2版(1984); 並びに HuiskapillerおよびWood, Nature, 323: 15~16 (1986)を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる。】

キメラ抗体は、典型的には遺伝子操作によって軽鎖および重鎖遺伝子が異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから作製されている抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変(V)セグメントをヒト正常(C)セグメント、例えば $\tau$ 、 $\mu$ および $\delta$ 、に結合することができる。典型的な異種用キメラ抗体はマウス抗体からのVまたは抗原結合領域とヒト抗体からのCまたはエフェクターフィールドとから成るハイブリッドタンパク質である(例えば、A. T. C. C. 登録番号CRL 9688は抗-Tac キメラ抗体を分離する)が、他の哺乳動物を用することもできる。

本明細書で使用する「フレームワーク領域」なる用語は、Kabatら、前掲により定義されたように、單一鎖において異なる免疫グロブリン間で比較的保存される免疫グロブリン柱鎖および並列可変領域の品目について呼称する。本明細書で使用する「ヒト様フレームワーク領域」なる用語は、各々存在する鎖においてヒト免疫グロブリン中のものと等しい少なくとも約70またはそれ以上のアミノ酸残基、典型的には75~85またはそれ以上のアミノ酸残基を含んで立るフレームワーク領域である。

本明細書で使用する「ヒト様免疫グロブリン」なる用語は、ヒト様フレームワーク領域を含んで立る免疫グロブリン

についてを及し、この場合、存在する任意の正常領域がヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に相同であり、即ち少なくとも約85~90%、好みしくは約95%が同一である。よって、おそらくCDRを除くヒト様免疫グロブリンの全ての部分が、1または複数の生来のヒト免疫グロブリン配列の対応品分と実質的に相同である。例えば、ヒト様免疫グロブリンはマウス可変領域/ヒト正常領域キメラ抗体を含まないだろう。

本発明の別の一般的観点によれば、ヒト化された免疫グロブリン鎖を含んで立る抗体の親和力を増加させるために、ヒト様またはヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の複数された数のアミノ酸が受容は $\tau$ よりもむしろ供与体 $\delta$ 中のそれらの位置のアミノ酸と同じであるように選択される基準も含まれる。

本発明のこの観点は、(例としてCDRの入手源としてマウス抗体を使って)ヒト化抗体を生産する従来方法における親和力の低下の2つの原因が、下記のためであるというモデルに基づく:

(1) マウスCDRをヒトフレームワークと結合する時、CDRに密接したフレームワーク中のアミノ酸がマウスの代わりにヒトになる。理論に詰め付けようとして、本発明者らは、それらの変更されたアミノ酸が供与体マウス抗体中とは異なる静電的または疎水的力を生じるため、それらがわずかにCDRを歪め、そして歪められたCDRは供与抗体中のCDRが行うのと同じくらい効率的な抗原との結合を行うことができないと考える;

(2) また、CDRに含めているがその一部ではない（即ちまだフレームワークの一部である）元のマウス抗体中のアミノ酸は、親和力の裏面である抗原との接触を行うことができる。全てのフレームワークアミノ酸がヒトにされるので、抗体がヒト化される時にそれらのアミノ酸は失われる。

これらの問題を回避するため、および所望の抗原に対し抗体に強力な親和力を有するヒト化抗体を生産するために、本発明はヒト化免疫グロブリンを設計するのに次の4つの基準を使用する。これらの基準を満足または必要な時は組み合わせて使用し、所望の親和力または他の特徴を獲得することができる。

基準I：受容体として、ヒト化しようとする供与体免疫グロブリンに非常に相向する特定のヒト免疫グロブリンからのフレームワークを使用するか、または多数のヒト抗体から、の共通のフレームワークを使用すること。例えば、データバンク（例えばNational Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource）中のヒト蛋白質（蛋白質）可変領域に対するマウス蛋白質（蛋白質）可変領域の配列の比較は、異なるヒト蛋白質に対する相向性の程度が典型的には約40%から約60-70%まで大幅に異なることを示す。受容体免疫グロブリンとして、供与体免疫グロブリンの蛋白質（それぞれ蛋白質）に最も相向するヒト蛋白質（それぞれ蛋白質）の1つを選択することにより、供与体免疫グロブリンから受容体免疫グロブリンに移る際にはほとんどアミノ酸が変化しないであろう。よって、ヒト化免疫グロブリン鎖を含んで立るヒト化抗体の正

確な全貌が供与抗体の形状と非常によく似ており、CDRを置める見込みを秘めることができる。

典型的には、重複フレームワークを提供するため、少なくとも約10-20の別個のヒト蛋白質の代表的コレクションの中の3~5の最も相同的な蛋白質可変領域配列のうちの1つが受容体として選択され、蛋白質についても同様にして選択されるだろう。好みしくは、1~3の最も相似な蛋白質のうちの1つが使用されるだろう。選択された蛋白質免疫グロブリン鎖は、供与体免疫グロブリンに対してフレームワーク領域内が最も好みしくは少なくとも約65%の相向性を有するだろう。

いかにして受容体免疫グロブリンを選択するかにかかわらず、受容体よりもむしろ供与体中のそれらの位置のアミノ酸と同じになるようにヒト化免疫グロブリン類のフレームワーク中の少数のアミノ酸を選択することによって、より高い親和力を獲得することができる。好みしくは、それらの基準の1つを満足するほどまたは全てのアミノ酸位置において、供与体アミノ酸が実際に選択されらるだろう。

基準II：ヒト受容体免疫グロブリンのフレームワーク中のアミノ酸が、普通でない（即ち「まれである」；本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中のヒト蛋白質（それぞれ蛋白質）V領域配列のたった約10%しかその位置に存在しないアミノ酸を示す）場合、またはその位置の供与体アミノ酸がヒト配列に典型的である（即ち「普通である」；本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中の少なくとも約25%の配列に存在するアミノ酸を示す）基

合、受容体よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。この基準は、ヒトフレームワーク中の普通でないアミノ酸が抗体構造を破壊しないことを保証するのに役立つ。更に、普通でないアミノ酸をまたまヒト抗体に典型的である供与体からアミノ酸で置換することにより、ヒト化抗体をヒト化感性にすることができる。

基準III：ヒト化免疫グロブリン鎖中の3つのCDRのすぐ近くの位置において、受容体アミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。それらのアミノ酸は、おそらく特にCDR中のアミノ酸と相互作用し、もし受容体から選択されれば供与体CDRを破壊しもして親和力を低下させるであろう。更に、近傍のアミノ酸は抗体と直接相互作用し（Amitら、*Science*, 233: 747-753 (1986)、これは参考として本明細書中に記載込まれる）、供与体からそれらのアミノ酸を選択することは元の抗体における親和力を保証する全ての抗原接觸を維持するのに望ましいかもしれない。

基準IV：典型的には元の供与抗体の3次元モデルは、CDRの外側の棒つかのアミノ酸がCDRに密着しておりそして水素結合、ファンデルワールス力、極性の相互作用等によりCDR中のアミノ酸と相互作用する相当な確率を有することを示す。それらのアミノ酸位置では、受容体免疫グロブリンアミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択される。この基準に従ったアミノ酸は、通常はCDR中の成る部位の約3人字位置内に側鎖原子を有し、そして獨立された化学的力、例えば上記に列挙した力に従ってCDR原子と相互作用すること

ができるような原子を含まなければならない。次々などのタンパク質のモデルを作成するためのコンピュータープログラムが一般に利用可能であり、そして当著者に周知である（Loewら、*Int. J. Quant. Chem., Quant. Biol. Symp.*, 15: 53-66 (1988); Bruscolieriら、*Science*, 233: 755-758 (1986) を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に記載される）。それらは本発明の部分を構成しない。実際、全ての抗体が類似の構造を有するので、Brookhaven Protein Data Bankから入手可能である既知の抗体を必要であれば別の抗体の蛋白質モデルとして利用することができる。商業的に入手可能であるコンピュータープログラムを用いてコンピューター画面にそれらのモデルを表示し、原子間の距離を算出し、そして色々のアミノ酸相互作用の可能性を評価することができる。

ヒト化またはヒト様抗体は、ヒト蛋白質において使用されるマウス抗体または他の場合にはキメラ抗体を上回る少なくとも3つの潜在的利点を有する：

1) エフェクター効果がヒトであるため、ヒト免疫系の他の部分と良好に反応することができる（例えば、抗体依存性細胞殺傷作用（CDC）または抗体依存性細胞障害作用（ADCC）により、より効率的に癌細胞を破壊する）。

2) ヒト免疫系は外来物としてヒト化抗体のフレームワークまたは定常細胞を認識しないであろう。従ってそのような注入抗体に対する抗体活性は全体的に外側のマウス抗体または部分的に外側のキメラ抗体に対するよりも小さいであろう。

3) 注入されたマウス抗体は、通常の抗体の半減期よりも

ずっと短いヒト第三中の半導期を有することが報告されている (S. Shiehら、*J. Immunol.*, 138: 4534-4538 (1987))。注入されたヒト化抗体は、おそらく天然のヒト抗体により類似した半導期を有し、より少量または少度の用量を与えることを可能にするだろう。

本発明は、EPA公報No 0239400に記載されたものに閉じて改変されたヒト化免疫グロブリン（例えば、ヒトIL-2レセプターに結合することができる）に特に向けられる。その出発明細書（その開示は本発明の範囲から除外される）は、成る種の免疫グロブリンについて、受容体抗原の種類または重複可変領域中のCDR領域を異なる供給元の抗体からのCDRの部品部分（典型的には各構造の影響を受けやすい部分）で置換することを記載している。また、その出発明細書は、成る種の免疫グロブリンについて、抗原結合部位から（結構に）必要されやすい残基を導入する可能性を記載しており、この残基は明らかに数つかのフレームワーク領域を含むことができる（特に、Heitlerら、*Science*, 233: 747-753 (1986)に記載されたような抗原結合に適することが既知である残基、またはおそらく接觸相互作用に必須である残基—ただしそれらの選択については該出発明細書において不十分な指針しか与えられていない）。例えば、本発明の特徴的な点は、全CDRアミノ酸およびCDRの1つ（または特徴として各々）のすぐ近くのフレームワークアミノ酸を置換することである。一般に、例えばコンホメーション（および普通はこれらの抗原結合特異性）を維持するためにCDRと連結をとる

仕事のフレームワーク残基が、上記に示すに記載された本発明の特徴的な点の範囲内に特に含まれる。

1つの観点において、本発明は、所望のエピトープ、例えばヒトIL-2レセプター上のエピトープ、に結合することができる免疫グロブリン（例えば抗-Tacモノクローナル抗体）からの変動および/または既存CDR（典型的には上述したような別のアミノ酸残基を有する）をコードする組換えDNAセグメントに向けられる。それらの領域をコードするDNAセグメントは、典型的にはヒト様フレームワーク領域をコードするDNAセグメントに結合されるだろう。例えば、発現時に抗-Tac重鎖および軽鎖可変領域（ヒト様フレームワーク領域と共に）を含んで成るポリペプチド鎖をコードする好きなDNA配列がそれぞれ図3と図4に示されている。コドン密度および重要でないアミノ酸残基のため、後述するようにこれらの配列の代わりに他の配列を容易に用いることができる。

前記DNAセグメントは、典型的には、ヒト様抗体のコード配列に作用可能に連結した発現調節DNA配列、例えば天然由来のまたは異因のプロモーター領域、を更に含むだろう。併しましては発現調節配列は、真核生物宿主細胞を対象としたトランスフェクションを実現することができるベクター中の真核生物プロモーター系であろうが、原核生物宿主用の調節配列を用いることができる。ベクターが適当な宿主中に組み込まれれば、宿主はスクレオチド配列の高レベル発現に適当な条件下で維持され、そして所望する時、軽鎖、重鎖、甚

第／重鎖二量体もしくは完全な抗体、結合性断片または他の免疫グロブリン型の収得および精製を行うことができる。

ヒト定式領域DNA配列は、端の方法に従って、我々のヒト細胞から、特徴的には不死化されたB細胞から導出することができる（Kabat、前掲およびNP 87/02571を参照のこと）。例えば、ヒトα免疫グロブリン定式およびJ領域遺伝子および配列はHeitlerら、*Cell*, 22: 197-207 (1980)中に記載されており、そしてヒト免疫グロブリンC<sub>1</sub>、遺伝子のヌクレオチド配列はEllisonら、*Nucleic Acid Res.*, 10: 4071 (1982)中に記載されている（その著者は参考として本明細書中に組み込まれる）。本発明の免疫グロブリンを作成するためのCDRは、所望の抗原（例えばヒトIL-2レセプター）に結合することができるモノクローナル抗体から同様にして得られ、そしてマウス、ラット、ウサギまたは抗体を生産することができる他の脊椎動物を含む任意の便利な哺乳動物起源において生産されるだろう。DNA配列の適当な起始部位並びに免疫グロブリンの発現および分泌のための宿主細胞は、多数の入手源、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手することができる（"Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", 第5版 (1985) Rockville, Maryland, U.S.A.; これは参考として本明細書中に組み込まれる）。

本明細書中に特定期に記載のヒト様免疫グロブリンに加えて、他の「実質的に相同的」免疫グロブリシンを容易に設計することができ、そして当著者に周知の種々な組換えDN

A技術を使って製造することができる。例えば、IL-2レセプター免疫グロブリンについては、フレームワーク領域は数つかのアミノ酸置換、末端および中間の付加および削除等により一次構造レベルで図3および図4の配列と異なることができる。更に、本発明のヒト様免疫グロブリンを基礎として、我々の異なるヒトフレームワーク領域を単独または組合せて用いることができる。一般に、遺伝子の構造は我々の専門的技術、例えば部位特異的突然変異説 (GillemanおよびSmith, *Gene*, 8: 81-97 (1979) 並びにRobertsら、*Nature*, 323: 731-734 (1987)を参照のこと；この両者は参考として本明細書中に組み込まれる）により容易に達成することができる。あるいは、一次抗体構造の一部分のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができ、この断片はまたは複数の免疫グロブリン活性（例えば荷物結合活性）を有する。また多數の遺伝子と同様、免疫グロブリン認識部位は、各々が1または複数の別個の生物活性を有する我々の既存性領域を含むため、該遺伝子を別の遺伝子からの既存性領域（例えば開示：1987年12月15日提出の一般保護されたU.S.S.N. 132,337を参照のこと。これは参考として本明細書中に組み込まれる）と融合させ、新規性質を有する融合タンパク質（例えば免疫結合）を製造することができる。

典型的に所望のヒト様抗体を発現することができる本発明の技術配列は、様々な異なるポリヌクレオチド（ゲノムDNAまたはcDNA、RNA、合成オリゴヌクレオチド等）および寡聚（例えばV、J、DおよびC領域）から、そして種々な其

なる性格により、充てしめらごとができる。通常なゲノム配列を述起することが最も一般的な製造方法であるが、cDNA配列を使用してもよい【ヨーロッパ特許公報No.6239403およびleichan,L.ら、*Nature* 222: 323-327 (1987) を参照のこと。この両者は参考として本明細書中に組み込まれる】。

前に述べたように、該DNA配列を免疾菌配列に作用可能に述起した(即ち、免疫を促進するように配置させた)後で該配列が宿主中で表現されるだろう。それらの表現ベクターは、典型的にはエビソームとしてまたは宿主染色体DNAの組込み部分として宿主中で複製可能である。一般に、表現ベクターに、所望のDNA配列により形質転換された細胞の検出を可能にするために選択マーカー、例えばテトラサイクリンまたはヌオマイシン耐性遺伝子を含むだろう(例えば、米国特許第4,704,362号を参照のこと;これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

大腸菌(*E. coli*)は本発明のDNA配列をクローニングするのに特に有用な原核生物宿主である。使用に適切な他の微生物宿主としては、バクテリス菌、例えばバクテリス・アブトリス(*Bacillus subtilis*)、及びに他の細胞内細胞、例えばサルモネラ菌(*Salmonella*)、セラチア菌(*Serratia*)および種々のショードモナス菌(*Pseudomonas*)種が挙げられる。それらの原核生物宿主では、典型的には宿主細胞と適合性のある表現調節配列(例えば複製開始点)を含むであろう表現ベクターを作製することもできる。加えて、任意の数の種々の周知のプロモーター、例えばラクトースプロモーター系、ト

リプトファン(*lvp*)プロモーター系、ターラクタマーゼプロモーター系、またはイフタージからのプロモーター系が存在するだろう。プロモーターは、典型的には所望によりオペレーター配列と共に発現を調節し、そして元写および翻訳を開始および終了させるためのリボソーム結合部位を有するだろう。

他の微生物、例えば酵母を発現に用いることもできる。ケックロミセス(*Saccharomyces*)は好ましい宿主であり、適当なベクターは、表現調節配列、例えば3-ホスホグリセレートキナーゼおよび他の解糖酵素プロモーターを包含するプロモーター、並びに所望により複製開始点、終止配列等を有する。

微生物に加えて、哺乳動物細胞細胞株を用いて本発明のポリペプチドを発現および生産せしめることもできる [Wienacker, "From Genes to Clones", VCH Publishers, N.Y., U.S.A. (1987) を参照のこと;これは参考として本明細書中に組み込まれる]。完全な免疾グロブリンを分離することができる多数の適当な宿主細胞系が技術の現状において開発されているため実際は真核細胞が好ましい。そのような真核細胞としては、CHO細胞系、種々のCOS細胞系、L929細胞、ミニローマ細胞系が挙げられるが、好ましくは元写に挿されたB細胞またはハイブリドーフである。それらの細胞のための表現ベクターは、表現調節配列、例えば複製開始点、プロモーター、エンハンサー [Queen,L.ら、*Journal, Rev.*, 89: 49-68 (1985);これは参考として本明細書中に組み込まれ

る]、および必要なプロセシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写ターミネーター配列を含むことができる。好ましい表現調節配列は、エンハンサーを有するSV40 (MulliganおよびBerg, *Science* 209: 1422-1427 (1980) を参照のこと)、免疾グロブリン遺伝子、アデノウイルス、ワシ乳頭瘤ウイルス等に由来するプロモーターである。

著目のDNAセグメント(例えば、重畠および軽畠コード配列並びに表現調節配列)を含むベクターは、細胞宿主のタイプに依存して異なる因式の方法により、宿主細胞中に移すことができる。例えば、原核細胞には塩化カルシウムトランスフェクション法が常用され、一方他の細胞宿主にはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用される[一般には、Haeziatisら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1982) を参照のこと;これは参考として本明細書中に組み込まれる]。

一度発現されれば、本発明の完全抗体は、それらの二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疾グロブリン形態を当該界の標準と、例えば免疫アソシニアム沈淀、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等に従って精製することができる(一般的には、Scopes,R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982) を参照のこと)。少なくとも約90~95%均次の実質的におよび免疾グロブリンが好ましく、98~99%またはそれ以上の均次が医療用途に好ましい。個別にまたは所望の時に均次まで精製

されれば、逐次的に(体外的を含む)またはアッセイ方法、免疾免疫染色法等を開発しそして実施する際にエボリューションペプチドを使用することができる[一般的には、*Immunological Methods*, 第1および2巻、LehrerらおよびPerussia編、Academic Press, New York, N.Y. (1979および1981) を参照のこと]。

本発明において示例されるIL-2レセプター特異抗体は、典型的にはT細胞介在性の病気状態を処置することに由いて個々に用いられるだろう。通常、所歴に因縁するだけがIL-2レセプターを有すると同定された場合、ヒトIL-2レセプターへのIL-2の結合を阻止することができるとト体抗体が適当である["Treating Human Malignancies and Disorders" と題するU.S.S.N.085,707 を参照のこと;これは参考として本明細書中に組み込まれる]。例えば、頻繁に遇する典型的な病気状態として、器官移植、例えば心臓、肺、腎臓、肝臓等の移植を行う患者における移植拒絶反応および対宿主性移植片病が挙げられる。他の病気としては、自己免疫疾患、例えば1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性紅斑狼瘡および重症筋膜炎が挙げられる。

本発明のヒト抗体は、別の抗体、特に病気の一因となる細胞上の別のマーカーと反応するヒトモノクローナル抗体と組合せて使用することもできる。例えば、適当なT細胞マーカーとしては、第一回国際白血球分化ワークショップ(First International Leukocyte Differentiation Workshop), *Leukocyte Typing*, Bernardら編、Springer-Verlag, N.Y.

(1984) (これは「考として本明細書中に組み込まれる」)により又名されたいわゆる「分化のクラスター (Clusters of Differentiation)」中に分類されるものを擇り取ることができる。

該抗体は、化学療法または免疫抑制剤と共に与えられる別々に投与される組成物として使用することができる。典型的には、そのような薬剤としては、シクロスボリンAまたはブリン類似物質 (例えばメトトレキセート、6-メルカプトブリソ等) が挙げられるだろうが、当該者に周知である多種の他の薬剤 (例えばシクロホスファミド、ブレドニゾン等) も使用することができる。

本発明の特徴的な医薬組成物は、免疫患者における当該抗体の使用を含んである。免疫患者は2つの成分により特徴づけられ、そしては臓器内または生体内において選択部位を攻撃するのに特に有用である。第一成分は、付着または吸収すると細胞に対して通常は致命的である細胞毒性物質である。「ゲリバリー性剤」として知られる第二成分は、毒性物質を特定の細胞タイプ、例えばガンを含む細胞に供給するための手段を提供する。この2成分は通常は様々な周知の化学的方法のいずれかによって一括に化学的に結合される。例えば、細胞毒性物質がタンパク質でありそして第二成分が完全な免疫グロブリンである時、結合は乳酸二抗体架橋剤、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等によらうことができる。日々の免疫患者の製造が当実界で開始であり、例えば“Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Hitting the Magic Bul-

let”, Thorpeら、Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, 158-190 (1982) 中に見つけることができる。これは参考として本明細書中に組み込まれる。

様々な細胞毒性物質が免疫患者における使用に適当である。細胞毒性物質としては、放射性核種、例えばラジウム-131、イットリウム-90、レニウム-188 およびビスマス-212; 多数の化学療法剤、例えばビンデシン、メトトレキセート、アドリアマイシンおよびシスプラチニン; 並びに細胞毒タンパク質、例えば、リボソーム遮断タンパク質はアメリカナガゴボウ抗ウイルスタンパク質、シュードモナス外毒素A、リシン、ジフェリア毒素、リシンA類等; または細胞表面活性な物質、例えばホスホリバーゼ酵素 (例えばホスホリバーゼC) を挙げることができる。[1988年12月23日に提出された一般検査されたU.S. S. I. 07/290,962; “Chimeric Toxins”, DiseaseおよびPhil., Pharmacol. Ther., 25: 355-351 (1982); 並びに “Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy”, BaldwinおよびByers 編、159-179, 224-266 頁, Academic Press (1985) を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に組み込まれる。]

免疫患者のゲリバリー成分は、本発明のヒト型免疫グロブリンを含むだろう。好みしくは完全な免疫グロブリンまたはそれらの結合性断片、例えばFabが使用される。典型的には、免疫器官の抗体はヒト IgM または IgG イソタイプのものであるだろう。しかし所望の時には他の哺乳動物型抗体を用いることもできる。

本明細書中に組み込まれる。

本発明の抗体は疾患のために施設化することができ、そして使用前に適当な粗体中で再構成することができる。この技術は從来の免疫グロブリンに関して効果的であることが示されており、当業界で既知の改組乾燥および再構成技術を用いることができる。改組乾燥と再構成は様々な種類の抗体活性の低下をもたらし得ること (例えば從来の免疫グロブリンでは、IgE抗体は IgG抗体よりも大きな活性低下を有する傾向がある)、そして使用レベルを調整して埋め合わせなければならないことがあることは、当該者により明白であろう。

本発明のヒト粗抗体またはその組合物を含むする組成物は、予防および/または治療目的のために投与することができる。治療用途においては、組成物は、既に病気にかかるている患者に、病気を治療するかまたは少なくとも部分的に抑制するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適切な量は「治療的有效量」と定義される。この用途に有効な量は、感染の度数および患者自身の免疫系の一般状態に依存するであろう。しかし通常は、用量あたり約1-約200mgの抗体、より好みしくは重量あたり5-25mgの用量が使用されるだろう。本発明の材料は通常は深剂な病気状態、即ち命にかかるかわるかまたはもしかすると命にかかる状況において使用されるだろうことを念頭に置かなければならぬ。そのような場合、本発明のヒト粗抗体により誘導される外因性物質の最小化および「外来物質」拒絶の低頻率の点からみて、笑気の過剰量の抗体を投与することが可能でありそして治療後に

本発明のヒト様抗体およびその医薬組成物は、特に穿通口、即ち皮下、筋肉内または静脈内投与に有用である。穿通口投与用組成物は、通常、許容される粗抗体、好みしくは水性粗抗体中に溶解された抗体の標本または組合物を含んで成るだろう。様々な水性粗抗体、例えば水、酸化された水、0.4%食塩水、0.3%グリシン等を使用することができる。それらの溶液は無毒であり、通常は粗状物質を含まない。それらの組成物は、常用される周知の滅菌技術により滅菌することができる。該組成物は、適切な生理的条件に必要である時は医薬上許容される補助物質、例えば防腐剤および緩衝剤、透析液等、例えば酢酸ナトリウム、氯化ナトリウム、氯化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含有することができる。それらの組成物中の抗体は広範囲に亘り異なることができ、即ち、少なくとも約0.5%未満から、通常は少なくとも約1%から、15-20%未満ほどまでに及ぶことができ、そして粗抗体の体積、粘度等に主として基づいて、選択された特定の投与形式に従って選択されるだろう。

筋肉内注射用の典型的医薬組成物は、1mgの無菌試験瓶と50μgの抗体を含むように調製することができる。静脈点滴注入用の典型的医薬組成物は、250μlの無菌リンガー瓶と150μgの抗体を含むように調製することができる。穿通口投与可能な組成物の実際の割合は当該者に周知であるかまたは明白であり、そして例えば Pennington's Pharmaceutical Science, 第15版、Haw Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) 中に詳細に記述されており、これは参考として

より望ましいと感じられるかもしれない。

予防用途においては、本発明の抗体またはその混合物を含有する組成物は、患者の抵抗力を高めるためにまだ病気状態でない患者に投与される。そのような型は「予防的有効性」として定義される。この用途の場合、正常な量は患者の免疫状態および免疫の一般レベルに依存するが、通常は用量あたり0.1～25mg、特に患者あたり0.5～2.5mgであろう。新しい予防用途は、腫瘍移植拒絶の防止である。

本発明のヒト抗体は、更に試験管内において広範な用途を見い出すことができる。一例として、T細胞の型決定、典型的IL-2レセプターを有する細胞または該レセプターの断片の半端、ワクチンの調製等に標的的な抗体を利用することができる。

診断目的に、抗体を標識してもよくまたは未標識であってもよい。未標識抗体は、ヒト抗体は反応性である別の標識抗体（二次抗体））、例えばヒト免疫グロブリン正常範囲に特異的な抗体と組合せて使用することができます。あるいは抗体を直接標識してもよい。様々な標識、例えば放射性核種、並光团、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、リガンド（特にハプテン）、等を使用することができる。多数の型式のイムノアッセイが利用可能であり、そして当業者に周知である。

細胞活性に対する保護もしくは検出または活性された抗原の存在の検出において問題の抗体を使用するためにキットを供給することもできる。本発明の問題の抗体組成物は、单独

または所望の二種タイプに特異的な追加の抗体と共に、各邊は1つの容器に実験室温度で提供することができる。抗体は標識もしくは未標識と組合されていても未標識であってもよく、載せ板、例えばTris、リン酸塩、戊酸塩等の緩衝液、安定剤、防腐剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミン等、および使用説明書のマットと共にキット中に含まれる。一般にこれらの材料は活性抗体の量を基にして約5重量%未満、通常は抗体濃度を基にして少なくとも約0.001重量%の合計量において存在するだろう。しばしば、活性成分を希釈するための不活性地盤または緩衝液を含めることが望ましく、この場合は溶液は全組成の約1～5%重量%で存在することができる。キメラ抗体を結合することができる二次抗体をアッセイにおいて使用することができ、これは通常は別の容器中に存在するだろう。二次抗体は典型的には標識と組合され、上述の抗体製剤と同様にして標識化される。

次の実施例は例示的目的で与えられ、規定のためではない。

## 実験

### ヒト標的蛋白および重複性蛋白の設計

ヒト化抗体のフレームワークを提供するためにヒト抗体E<sub>u</sub>の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, E.ら, U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983)を使用した。というのは、抗-Tac の遺伝子のアミノ酸配列がNational Biomedical Foundation Protein Identification Resource 中の他のいずれの遺伝子よりもこの抗体

の直譜に相容性が高かったためである。

ヒト化重複の配列を選択するために、抗-Tac 並列配列（一般標識されたU.S.S.N.の188,862と223,037を参照のこと）。これらは参考として本明細書中に記載される）をE<sub>u</sub>並列配列と対照した（図1）。各位位置において、その位置が次のカテゴリーのいずれか1つに入らない限り、E<sub>u</sub>アミノ酸をヒト化配列のために選択した。次のカテゴリーのいずれか1つに入る場合、抗-Tac アミノ酸を選択した。

(1) その位置が、Kabatら、前掲により定義されたような相対性決定領域(CDR) 中にある (アミノ酸31～35, 50～66, 99～105)；

(2) その位置ではE<sub>u</sub>アミノ酸がヒト並列配列にまれてあり、一方抗-Tac アミノ酸がその位置でヒト並列配列に典型的であった (アミノ酸27, 93, 95, 98, 107～109, 111)；

(3) その位置が抗-Tac 並列のアミノ酸配列中のCDRのすぐ近くであった (アミノ酸30と67)；

(4) 抗-Tac 抗体の3次元モデルが、該アミノ酸が抗原結合部位に物理的に密接していることを示唆した (アミノ酸43と68)。

2つ目のアミノ酸はそれらのカテゴリーのうちの複数に入るが、それらは1つのカテゴリーにのみ挙げてある。

ヒト化重複の配列を選択するために、抗-Tac 並列配列をE<sub>u</sub>並列の配列と対照させた（図2）。その位置が同じくカテゴリー(1)～(4)のうちの1つに入らない限り、E<sub>u</sub>アミノ酸を各位位置において選択した（カテゴリー対象中の重複を軽減で置き換える）：

(1) CDR (アミノ酸24～34, 50～55, 89～97)。

(2) E<sub>u</sub>よりも抗-Tac アミノ酸がより典型的である (アミノ酸48と63)。

(3) CDRに近い (アミノ酸なし；E<sub>u</sub>と抗-Tac はそれらの位置全てにおいて既に同じであった)。

(4) 組合領域に3次元的に近接している可能性 (アミノ酸60)。

重複 (図3) と対照 (図4) の両者のスクレオチド配列は次のようにして選択した。

(1) 両スクレオチド配列は上述のようにして選択したアミノ酸配列をコードする。

(2) これらのコード配列の5'側のスクレオチド配列はリーダー (シグナル) 配列、即ち KOPC 53抗体の核糖のリーダーおよびPCP 108A抗体の重鎖のリーダー (Kabatら、前掲) をコードする。これらのリーダー配列を抗体の典型として選択した。

(3) コード配列の3'側のスクレオチド配列は、抗-Tac 配列の一端であるマウス軽鎖J5セグメントおよびマウス重鎖J5セグメントに由来する配列である。それらの配列はスプライス供体配列を含むするために含まれる。

(4) 配列の各末端には、Ib<sub>1</sub>1部位での切断およびペクターのIb<sub>1</sub>1部位へのクローニングを可能にするためのIb<sub>1</sub>1部位が存在する。

### ヒト化軽鎖および重鎖遺伝子の作製

重鎖を合成するために、Applied Biosystems 380B DNA 合成装置を使って4つのオリゴスクレオチド KES12, KES13, KES14, KES15 (図 5 A) を合成した。それらのオリゴスクレオチドの2つは、遺伝の各々の一端であり、そして各オリゴスクレオチドはアニーリングを可能にするために約20スクレオチドが次のスクレオチドとオーバーラップしている (図 5 B)。これらのオリゴスクレオチドは一端にすると、Iba1 部位での切断を可能にするために各末端にはつかの余分なスクレオチドを有する完全なヒト化軽鎖をカバーする。該オリゴスクレオチドをボリアクリルアミドゲルから精製した。

各オリゴスクレオチドを、標準手順 (Maniatis, 前掲のこと) により ATP と T4 ポリスクリオキナーゼを使ってリン酸化した。リン酸化したオリゴスクレオチドをアニーリングするために、それらを各々約 3.75 μl の濃度において 40 μl の TA (23 mM Tris-HCl, pH 7.9, 66 mM 酸性カリウム、10 mM 酸性マグネシウム) 中に一緒に熱めし、4 分間 95°C で加熱し、そして 4°C にゆっくり冷却した。各オリゴスクレオチドの反対端を合成することにより該オリゴスクレオチドから完全な遺伝子を合成するために (図 5 C)、次の成分を 100 μl の最終容積において添加した：

10 μl アニールしたオリゴスクレオチド  
各 0.16 μM デオキシリボスクレオチド  
0.5 mM ATP  
0.5 mM DTT

スクレオチドをボリアクリルアミドゲルから精製した。経験因子はそれらのオリゴスクレオチドから 2 部分において合成した。JF01 と JF02 各々 0.5 μl を 20 μl のシーケンサー緩衝液 (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM 酸性マグネシウム、50 mM 酸性ナトリウム) 中に混合し、70°C で 3 分間加熱し、そして該オリゴスクレオチドをアニーリングさせるためにゆっくりと 23°C まで冷却した。JF03 と JF04 も同様にして処理した。各反応液を DTT 10 mM および各デオキシリボスクレオチド 0.5 mM にし、6.5 μl のシーケンサー (DS Biochemicals) を最終容積 24 μl において添加し、そして 37°C で 1 時間インキュベートして該スクレオチドの反応方向を合成した。各反応液に Iba1 と HindIII を追加して DNA を消化した (JF02 と JF03 がオーバーラップする領域の中、使って合成された DNA の各々の中に HindIII 酶位が存在する: 図 6 B)。反応液をボリアクリルアミドゲル上で泳動し、Iba1 - HindIII 断片を精製し、そして標準法により pUC19 中にクローニングした。各断片について数回のプラスミド単離物をジテオキシソウにより配列決定し、そして正しいものを選択した。

ヒト化軽鎖および重鎖を発現させるためのプラスミドの作製  
最初 Iba1 断片が挿入されている pUC19 プラスミドから該断片を除去し、そして標準法により正しい方向においてベクター pVR1 (一般に選ばれた U.S.S.N. 223,037 を参照のこと) の Iba1 酶位に挿入し、プラスミド pHuGTAC1 (図 7) を作製した。このプラスミドは、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの発現を発現するだろう。

特許平4-502408 (11)

100 μl / ml BSA  
3.5 μl / ml T4 多機能タンパク質 (DNA ポリメラーゼ)  
25 μl / ml T4 多機能タンパク質 (ポリメラーゼ補助タンパク質)  
25 μl / ml 4S タンパク質 (ポリメラーゼ補助タンパク質)

この混合物を 37°C で 30 分間インキュベートした。次いで 10 μl の T4 DNA リガーゼを添加し、そして 37°C で 30 分間インキュベートした。70°C で 15 分間反応液をインキュベートすることにより、ポリメラーゼとリガーゼを不活性化した。遺伝子を Iba1 で切断するため、反応液に 200 μl / ml の BSA と 1 mM の DTT を含む 50 μl の 2 × TA, 43 μl の水、および 5 μl 中の 50 μl の Iba1 を添加した。反応液を 37°C で 3 時間インキュベートし、そしてゲル上で泳動した。ゲルから 431 bp の Iba1 断片を精製し、そして標準法によりプラスミド pUC19 の Iba1 酶位中にクローニングした。4 つのプラスミド単離物を精製し、ジテオキシソウによって配列決定した。そのうちの 1 つが正しい配列を有した (図 3)。

軽鎖を合成するために、4 つのオリゴスクレオチド JF01, JF02, JF03, JF04 (図 6 A) を合成した。それらのオリゴスクレオチドの 2 つは、経験の各々の一端であり、そして各オリゴスクレオチドはアニーリングを可能にするために約 20 スクレオチドが次のスクレオチドとオーバーラップしている (図 6 B)。該オリゴスクレオチドは一端にすると、Iba1 酶位での切断を可能にするために各末端にはつかの余分なスクレオチドを有する完全なヒト化軽鎖をカバーする。該オリ

2 つの経験 Iba1 - HindIII 断片が挿入されている各 pUC19 プラスミドからそれらの断片を単離した。ベクター プラスミド pVR1 (一般に選ばれた U.S.S.N. 223,037 を参照のこと) を Iba1 で切断し、標準法により脱リン酸化そして 2 断片を連続せしめた。所望の反応生成物は次のような形状を有する：ベクター - Iba1 - 断片 1 - HindIII - 断片 2 - Iba1 - ベクター。数回のプラスミド単離物を削除マッピングと配列決定により分析し、この形態を有する 1 つのプラスミドを選択した。このプラスミド pHuLTAC (図 8) は完全なヒト化軽鎖 (図 4) を含有し、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの発現を発現するだろう。

### ヒト化抗体の合成および親和力

プラスミド pHuGTAC1 および pHuLTAC をマウス Sp2/0 細胞中にトランスフェクトし、そして該プラスミドを組み込んだ細胞を、プラスミド上の gpt および hyg 遺伝子 (図 7, 8) により付与されるミコフェノール酸および/またはヒグロマツイシン B に対する耐性に基づいて選択により選択した。これらの細胞が IL-2 レセプターに結合する抗体を分泌したことを確かめるために、細胞からの上清を IL-2 レセプターを発現することが知られている HUT-102 細胞と共にインキュベートした。洗浄後、細胞をフルオレセンス検査器を用いたヒト抗体と共にインキュベートし、洗浄し、そして PACSCAN サイトフルオロメーター上で蛍光について分析した。結果 (図 9 A) は、ヒト化抗体がそれらの細胞には結合するが、IL-2 レセプターを発現しない Jurkat 細胞には結合しな

い(図9D)ことを明らかに示す。対照として、もとのマウス抗-Tac 抗体を用いてそれらの細胞を染色すると同様な結果を与えた(図9B, C)。

更なる実験のために、ヒト化抗体を生成する細胞をマウスに注入し、そして生じた腫瘍を回収した。腫瘍液に從って Affigel-10 支持体(Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA)上に凝製されたヤギ抗ヒト免疫グロブリン抗体のアフィニティーカラムに通過させることにより、腫瘍からヒト化抗体を実質上均質まで精製した。もとの抗-Tac 抗体に比較してヒト化抗体の親和力を測定するために、競合的結合実験を行った。約  $5 \times 10^5$  個の HUT-102 細胞を黒鼠(10-40ng)の抗-Tac 抗体とヒト化抗-Tac 抗体と共に4で10分間インキュベートした。次いで細胞に 100ng のビオチン化抗-Tac を添加し、そして4で30分間インキュベートした。この量の抗-Tac は細胞上の結合部位を飽和するのに十分であり、大過剰であってはならないことが予め決定されている。0.1% アジ化ナトリウムを含む 2% のリン酸緩衝化粧液(PBS)で細胞を2回洗浄した。次いで 250ng のフィコニリトリリン結合アビシンと共に細胞を4で30分間インキュベートし、この結合アビシンは既に細胞に結合しているビオチン化抗-Tac に結合した。細胞を上記のように再び洗浄し、1% バラホルムアルデヒドを含む PBS 中で固定し、そして FACSCAMライフルオロノーテー上で蛍光分析した。

第一段階における結合体としての抗-Tac 抗体の使用量を増加していくと(10-40ng)、第二段階において細胞に結合

することことができたビオチン化抗-Tac の量を減少させ、從って腫瘍液において結合したフィコニリトリリン結合アビシンの量を減少させ、こうして蛍光を減少させた(図10A)。当量(20ng)の抗-Tac および結合体として使ったヒト化抗-Tac は、蛍光をほぼ同じ程度に減少させた(図10B)。このことは、それらの抗体がほぼ同じ親和力(3~4倍以内)を有することを示す。というのは、もし一万倍ずつ大きな親和力を有するなら、より有效地にビオチン化抗-Tac と競争し、從って蛍光をもっと減少させたであろうからである。  
ヒト化抗体の生物学的性質

ヒトの病気の処置における適切な使用のため、ヒト化抗体は I.L.-2 レセプターを発現している体内的 T 細胞を標的とすることができるべきである。抗体が標的細胞を破壊しはる一つの機序は、ADCC と略される抗体依存性細胞障害作用(Fundamental Immunology, Paul, W. 编, Raven Press, New York (1984), 681頁)であり、この場合抗体は、標的細胞と標的を溶解することができるマクロファージのようなエフェクターファシズムとの間に橋権を形成する。ヒト化抗体と元のマウス抗-Tac 抗体が ADCC を媒介することができるかどうかを決定するために、腫瘍液によりクロム放散アッセイを行った。詳しくは、I.L.-2 レセプターを発現するヒト白血病 HUT-102 細胞を  $^{51}\text{Cr}$  と共にインキュベートし、それらにこの放射性標識を吸収させた。次いで HUT-102 細胞を過剰量の抗-Tac またはヒト化抗-Tac 抗体のいずれか一方と共にインキュベートした。次にヒト粗抗体 I.L.-2 との約20時間のインキュ

ベーションによって活性化された通常の精製ヒト末梢血単核細胞である 30 : 1 または 100 : 1 の比のエフェクター細胞と共に 4 時間インキュベートした。標的 HUT-102 細胞の溶解を示す  $^{51}\text{Cr}$  の放出を測定し、そしてバックグラウンドを差し引いた(表1)。その結果は、どちらの比のエフェクターファシズムにおいても、抗-Tac には有意な数の標的細胞を溶解しなかった(5%未満)が、一万ヒト化抗体は溶解した(20%より多く)ことを示す。従って、ヒト化抗体は、T 細胞白血病または他の T 細胞介在癌の病気を治療することにおいて、おそらく元のマウス抗体よりも効果的であろう。

表 1  
ADCC の  $^{51}\text{Cr}$  産出率(%)

抗体	エフェクター : 標的比	
	30 : 1	100 : 1
抗-Tac	4%	< 1%
ヒト化抗-Tac	24%	23%

上記から、本発明のヒト化免疫グロブリン抗体の抗体の多くの利点を提供することは明らかであろう。例えば、抗-Tac マウスモノクローナル抗体と比較すると、本発明のヒト化 I.L.-2 レセプター免疫グロブリンは、より経済的に生産することができ、そして実質的に少ない外来アミノ酸配列を含むことができる。ヒト型への導入後に抗原性となる可能性の減少は、上記の基盤に従って設計された免疫グロブリンにとって有意な変性的改善を意味する。

本発明を明示化および理解のために技術的実施例によ

り般分野に記載してきたが、添付の請求の範囲内で幾つかの変更および改良を行い得ることは明らかであろう。

FIGURE 1

2	V	L	T	O	S	S	A	I	N	S	A	S	P	E	Y	T
0	O	X	T	O	S	P	S	T	L	S	A	S	Y	S	Y	T
1	T	G	S	S	S	S	I	S	H	M	R	V	F	O	S	P
2	T	G	R	A	C	S	S	E	T	Y	L	A	T	O	A	P
3	T	S	P	E	L	V	T	T	F	S	X	L	A	S	G	T
4	T	A	P	L	L	V	T	T	S	X	L	A	S	G	T	P
5	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	G	T	S
6	T	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	H	A
7	T	O	A	A	T	T	T	E	F	L	T	T	I	S	S	L
8	T	O	F	A	T	T	T	H	O	A	S	T	P	L	T	G
9	T	T	A	T	T	T	T	Q	U	T	S	S	D	A	N	G

**FIG. 2**

TCTAGATGGAGACCCATACTCCCTCTGATAGCTCTGCCCTGCTATGCTTCCGATCCTGGATCA  
 M E T O T L L Y V L L L W Y P G S S  
 CCGGAGATATTCGACATACCCGATCTGCGATTAACCCCTCTGCTACCCGGATAGG  
 T G D I Q M T Q S P S T L S A S T C D R  
 TCACCATAACTCTGCTCTGGCAACGTTAAGCTTAAACTTACCCGCTCTGCTACCCGGAGACG  
 Y T I T C S A S S S I S T H H V T O O K  
 CAGCCAAACGCTCCAAACGTTCTAAATTATACCCGATCCGACCTGCTCTGCTACCCG  
 P G X A P A L L I T T I S L A S G Y P  
 CTCTCTTCACTGGCACTGGATCTGCTACCCGACTTCACCCGCTACAATCTCTCTGCAC  
 A R F S I S G S G T E F T L T I S S L O  
 CAGATGATTTCGCTCTTAACTTACCCGATCCAAACGCTACTTACCCGCTACCCGCTACCCG  
 P D D F A T T I C H O R S I T P L T F G  
 AGCCGACCAAGCTGCGATTAACCTAAAGCTACCCGCTACCCGCTACCCGCTACCCG  
 Q S T Y E V I

FIG.—4.

5

FIG. 3.

FIG. 6.

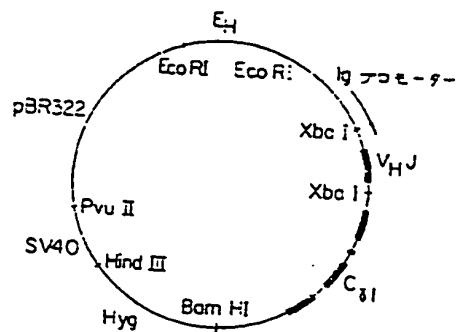
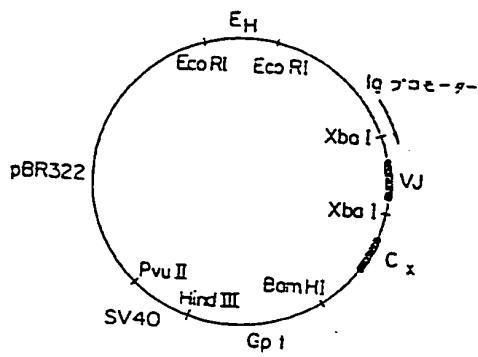


FIG. 7.



**FIG. 8.**

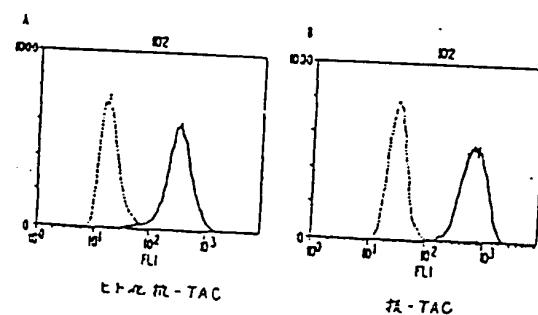


FIG. 9.

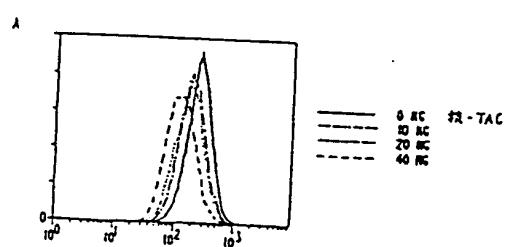
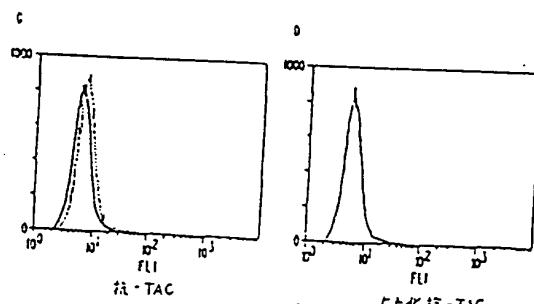


FIG. J0.



-14-

PCT-A7408/1998

14. ~~the~~ ~~invention~~ ~~was~~ ~~the~~ ~~entity~~ ~~of~~ ~~invention~~ ~~is~~ ~~located~~

3. Wistaria 19-1, 19 and 19, stems to 4 centimeters in diameter at the base, with a number of slender 2 cell ovaries near the base; gynoecium, characteristic in Class 300, slender and the style has no papillae at its tip.

4. Wistaria 20-1 and 20, stems to 4 centimeters in diameter at the base, gynoecium, characteristic in Class 300, slender at first, later 2 cell ovaries and pubescence hairy.

All plants 16 and 17, stems to 400 mm according to a narrow standard region and varying size of a gynoecium, slender, characteristic in Class 300, slender at first.

The observations are grouped according to the width of gynoecium, characteristic in class 300. The observations are discussed, made from the other features of the following classes:

Observations Group III and Group II are related to mainly flowers created by intermediate floral processes (pseudanthia).

Observations Group I and Group III are related to combinations and combinations, also, the presence of which can be seen in some of a non-pseudanthial process, which differs from the extent of Group II.

RECORDED AND INDEXED BY JOHN H. COOPER 1969-11-19

- SCIENCE, Volume 229 Issued 20 September 1985  
MARTIN "Transformers provide novel channel  
candidates," pp. 1222-1223. See entire document.

SCIENCE, Volume 232 Issued 07 May 1986 MALKIN  
"The structure, function and expression of inter-  
leukin-1 receptors on normal and malignant fibro-  
blasts," pp. 723-731. See entire document.

JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Volume 134(4) Issued  
14 April 1985 KIRKMAN "A monoclonal antibody  
(anti-T) reactive with activated and function-  
ally mature human T cells." See entire document.

SCIENCE, Volume 239 Issued 31 March 1988  
WILSON ET AL "Reassessing human interleukins:  
profiling an anti-cytokine activity," pp. 1334-  
1336. See entire document.

MARTIN, Volume 231 Issued 25 May 1986 JONES ST AL  
"Assessing the complementarity-determining regions  
in a human antibody with tides from a mouse,"  
pp. 1223-1223. See entire document.

MARTIN, Volume 232 Issued 24 March 1986 EICHENBERG  
"Reassessing human antibodies for therapy,"  
pp. 1219-1226. See entire document.

第1頁の続き

特表平4-502408 (16)

④Int. Cl.

A 61 K 39/395  
C 07 K 15/05  
C 12 N 5/10  
15/13  
//(C 12 P 21/09  
C 12 R 1:91)

識別記号

片内整理番号  
U 8829-4C  
7731-4H

優先権主張 ④1989年2月13日④米国(US)④310,252

②発明者 セリク, ハロルド エドワイン アメリカ合衆国, カリフォルニア 94002, ベルモント, サニースロープ アベニュー 1673